

Опыт применения медицинской технологии диагностики врожденной аниридии в ФГБНУ «МГНЦ»

Марахонов А.В.^{1,2}, Васильева Т.А.¹, Воскресенская А.А.³, Кадышев В.В.¹, Поздеева Н.А.³, Шилова Н.В.¹, Браславская С.И.¹, Хлебникова О.В.¹, Зинченко Р.А.^{1,4}, Куцев С.И.^{1,4}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», e-mail: renazinchenko@mail.ru

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования

«Московский физико-технический институт (государственный университет)»

³ Чебоксарский филиал Федерального государственного автономного учреждения «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

⁴ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

«Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: renazinchenko@mail.ru

Врожденная наследственная несиндромальная аниридия (ВА) — моногенный врожденный порок развития органа зрения с аутосомно-доминантным типом наследования, встречающийся в популяции с частотой 1:45 000–100 000 населения. ВА характеризуется врожденным отсутствием радужной оболочки глаза или врожденной гипоплазией большей ее части. ВА может быть: несиндромальной, которая, однако, часто затрагивает все структуры глаза (75 % случаев) и синдромальной (20%, включая WAGR синдром). Часть форм ВА, как изолированной, так и синдромальной, обусловлена гетерозиготными мутациями в гене *PAX6* и хромосомными перестройками, вовлекающими регион 11p13. Делеции в том же регионе, но с вовлечением, помимо гена *PAX6*, еще и гена *WT1* приводят к синдрому WAGR. В исследование включены 110 пациентов с предположительным диагнозом изолированная врожденная аниридия из 84 неродственных семей и 7 пациентов из 7 неродственных семей — с диагнозом *синдром WAGR*. Применяемая комплексная подтверждающая и дифференциальная ДНК-диагностика ВА и синдрома WAGR состоит из двух основных последовательных этапов: MLPA анализа (с подтверждением обнаруженных делеций с помощью анализа потери гетерозиготности или FISH) и секвенирования по Сэнгеру. Эффективность применения MLPA-анализа в качестве первоначального метода диагностики составляет 33% (30/91). Эффективность применения секвенирования в качестве единственного метода диагностики ВА вне предлагаемой комплексной технологии в выборке российских больных составила бы 63,7% (58/91). В результате использования предлагаемой технологии диагноз подтвержден у 107 пациентов (81 пробанда) с несиндромальной ВА и 7 пациентов с синдромом WAGR, определены частые в выборке пациентов из России *PAX6* мутации. Эффективность применения двух последовательных этапов комплексной технологии подтверждающей и дифференциальной диагностики ВА в выборке пациентов из России составила 96,7% (88/91).

Ключевые слова: врожденная аниридия, синдром WAGR, *PAX6*, MLPA, 11p13, внутригенные мутации, крупные хромосомные делеции.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ (гранты 17-04-00475, 17-04-00288) и Российского научного фонда (грант 17-15-01051). Часть исследований оплачена Благотворительным фондом «Созидание».

Application of medical technology for the diagnosis of congenital aniridia at the research centre for medical genetics

Marakhonov A.V.^{1,2}, Vasilyeva T.A.¹, Voskresenskaya A.A.³, Kadyshchev V.V.¹, Pozdeyeva N.A.³, Shilova N.V.¹, Braslavskaya S.I.¹, Khlebnikova O.V.¹, Zinchenko R.A.^{1,4,*}, Kutsev S.I.^{1,4}

¹ Research Center for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

² Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, Russian Federation

³ Cheboksary branch of S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Cheboksary, Russian Federation

⁴ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

* e-mail: renazinchenko@mail.ru

Congenital aniridia is a Mendelian autosomal dominant panocular disorder with complete penetrance and variable expressivity. The incidence of aniridia is 1 in 40,000-100,000 births. Aniridia is characterized by congenital absence of the iris with foveal hypoplasia and other eye abnormalities. Aniridia occurs as non-syndromic which, however, often affects all eye structures (75% of cases) and syndromic (20%, including WAGR syndrome). The most cases of aniridia, both isolated and syndromic, is caused by heterozygous mutations in the *PAX6* gene or chromosome 11p13 rearrangements. Large deletions of the same region affecting *PAX6* and *WT1* genes loci lead to the WAGR syndrome. 110 patients with a preliminary diagnosis of congenital aniridia from 84 unrelated families and 7 patients from 7 unrelated families diagnosed with WAGR syndrome were included into the study. The applied complex confirmatory and differential DNA diagnosis of aniridia and WAGR syndrome consists of two main sequential steps: MLPA analysis (with confirmation of the detected deletions using the loss of heterozygosity analysis and/or FISH) and Sanger sequencing. The effi-

ciency of MLPA analysis as an initial diagnostic method is 33% (30/91). The effectiveness of sequencing as the only method for diagnosis of aniridia is 63.7% (58/91). As a result of the application of complex medical technology at the Research Centre for Medical Genetics, the diagnosis was confirmed in 107 patients (81 probands) with aniridia and 7 patients with WAGR syndrome. Frequent *PAX6* mutations and 11p13 deletions were identified. The effectiveness of two-staged technology for congenital aniridia diagnosis is 96.7% (88/91).

Key words: congenital aniridia, WAGR syndrome, *PAX6*, MLPA, 11p13, intragenic mutations, large chromosome deletions.

Введение

Врожденная наследственная несиндромальная аниридия (ВА, OMIM #106210) — наследственный врожденный порок развития (ВПР) органа зрения с аутосомно-доминантным типом наследования, встречающийся в популяции с частотой 1:45 000—100 000 населения [1]. ВА характеризуется врожденным отсутствием радужной оболочки глаза или врожденной гипоплазией большей ее части. ВА может быть несиндромальной, которая, однако, часто затрагивает все структуры глаза (75% случаев) и синдромальной (20%, включая синдром WAGR) [2]. Синдромальные формы аниридии включают:

- а) ВА, отягощенную поражением ЦНС, эндокринной, мочеполовой и других систем и органов (<10%);
- б) синдром WAGR (<10%);
- в) нетипичные редкие формы ВА, возникающие на фоне других сложных моногенных или хромосомных заболеваний [3, 4].

Часть форм ВА, как изолированной, так и синдромальной обусловлена гетерозиготными мутациями в гене *PAX6* (OMIM *607108), а также хромосомными перестройками, вовлекающими регион 11p13 [4—6]. Делеции в этом регионе, но с вовлечением, помимо гена *PAX6*, еще и гена *WT1* приводят к синдрому WAGR. Синдром WAGR встречается, в основном, в виде спорадических случаев. Во всех спорадических случаях ВА до установления генетической причины больной имеет 50%-ный риск развития нефробластомы до 8 лет жизни [7].

Около 2% случаев аниридии ассоциированы с другими моногенными и хромосомными синдромами, более редкими по частоте [8].

Кроме того, сходные с вызванной мутациями в гене *PAX6* ВА фенотипы могут быть также ассоциированы

с мутациями в генах *FOXC1* (OMIM *601090), *PITX2* (OMIM *601542), *PITX3* (OMIM *602669) и других (~3% пациентов) [9—11].

Мутации в генах *FOXC1* и *PITX2* обычно ассоциированы с синдром Аксенфельд-Ригера и аномалией Петерса. Учитывая схожесть фенотипов, приходится проводить дифференциальную диагностику несиндромальной аниридии с этими пороками развития переднего отрезка глаза. Значительную сложность в молекулярном подтверждении диагноза ВА представляет и гетерогенность молекулярных механизмов повреждения гена *PAX6*. Они включают в себя не только точковые мутации, но и крупные хромосомные перестройки с вовлечением области p13 хромосомы 11 [12]. Хромосомные перестройки в ряде случаев могут затрагивать не кодирующую часть гена *PAX6*, а дистальный 3' *цис*-регуляторный район, находящийся на расстоянии 150 т.п.н. от гена [13].

В лаборатории генетической эпидемиологии ФГБНУ «МГНЦ» разработана комплексная медицинская технология подтверждающей и дифференциальной диагностики ВА [14, 15]. В настоящей работе представлены результаты применения медицинской технологии для диагностики ВА у 117 пациентов из 91 неродственной семьи.

Основные этапы технологии

От всех обследованных больных или их законных представителей (родителей) получено информированное согласие на участие в обследовании, обработку персональных данных и проведение лабораторной диагностики. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ».

Таблица

Результаты применения комплексной диагностики ВА в выборке из 117 пациентов из 91 неродственной семьи из России

Диагноз	<i>PAX6</i> анализ			Всего изучено пациентов	
	Точковые внутригенные мутации	Делеции (MLPA)	Количество пробандов без <i>PAX6</i> мутаций		
WAGR	0	7	0	7	62 спорадических случая
Спорадическая ВА	35	17	3	55	
Семейная ВА	23	6	0	29	
Все	58	30	3	91	

В исследование включены 110 пациентов с предположительным диагнозом *изолированная врожденная аниридия* из 84 неродственных семей и 7 пациентов из 7 неродственных семей — с диагнозом *синдром WAGR*. Изучено 29 семейных случаев ВА и 59 единичных (в том числе семеро пациентов с синдромом WAGR). Возраст пациентов варьировал от 6 месяцев до 65 лет (средний возраст 16 лет), большинство больных в выборке (67 чел.) обследованы в возрасте до 12 лет. Диагноз поставлен на основании клинической картины в ФГБНУ «МГНЦ» (63 пациента) и в Чебоксарском филиале ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» (54 пациента).

Применяемая комплексная подтверждающая и дифференциальная ДНК-диагностика ВА и синдрома WAGR состоит из двух последовательных этапов.

Первый этап. Высокий риск и злокачественность опухоли почки при синдроме WAGR определяют важность проведения ранней дифференциальной диагностики и первоочередность анализа вариаций числа копий генов в регионе 11p13 у пациентов с ВА. Данный этап проводится методом MLPA анализа и валидации обнаруженных делеций:

а) в случае обнаружения крупных делеций, затрагивающих ген *WT1*, — флуоресцентной *in situ* гибридизацией (FISH) с зондом, специфичным к гену *WT1*;

б) в остальных случаях — генотипированием отягченных семей по 12 микросателлитным маркерам хромосомы 11.

Второй этап. При отсутствии в образце ДНК пробандов крупных структурных изменений региона 11p13 методом прямого секвенирования по Сэнгеру определяются точечные изменения гена *PAX6* и подтверждается патогенный характер вновь найденных мутаций.

Результаты и выводы

В результате MLPA-анализа протяженные хромосомные делеции выявлены у 23 пробандов с несиндромальной ВА и у 7 с синдромом WAGR.

У пациентов с ВА обнаружены делеции, захватывающие locus гена *PAX6* и/или locus соседних генов, длиной от 3 т.п.н. до 7,5 млн п.н.

В 8 неродственных семьях (12 пациентов) определена делеция региона 11p13, которая затрагивает удаленную 3' *цис*-регуляторную область, но оставляет интактной кодирующую последовательность гена *PAX6*. Длина делетированного участка может варьировать от 500 до 1500 т.п.н.

У 12 пробандов определены делеции, захватывающие оба гена: *PAX6* и *WT1*. Делеции WAGR-области были верифицированы методом FISH по характерному паттерну гибридизации — единичному сигналу, соответствующему locusу *WT1*. В результате семерым пациентам с синдромом WAGR диагноз подтвержден молекулярно-генетическими методами. У 3 из 5 пробандов

с ВА и выявленными делециями WAGR-области диагноз *синдром WAGR с развитием опухоли Вильмса* может подтвердиться позднее (из-за раннего возраста большого опухоли могла еще не развиться). Этим пациентам рекомендован мониторинг состояния почек (УЗИ каждые 3 месяца) и наблюдение у онколога.

Эффективность применения MLPA анализа в качестве первоначального метода диагностики составляет 33% (30/91).

У оставшихся 67% (61/91) пробандов с ВА несбалансированных хромосомных перестроек, затрагивающих сегмент 11p13, не обнаружено.

Внутригенные мутации в гене *PAX6* выявлены у 58 пробандов с предположительным диагнозом *несиндромальная ВА*. Из 58 идентифицированных мутаций 28 — ранее не описанные, а 30 описаны другими авторами и зарегистрированы в базе данных о мутациях в гене *PAX6* [3]. Определены 24 нонсенс-мутации, 15 мутаций сдвига рамки, 5 миссенс-мутаций, 1 СТЕ (приводящая к С-концевому удлинению белка), 2 изменения сайта инициации трансляции, 11 мутаций, нарушающих сплайсинг. Все обнаруженные в данном исследовании мутации зарегистрированы в открытой базе данных о мутациях человека LOVD 3.0 (<http://databases.lovd.nl/shared/genes/PAX6>) и Clinvar.

У 13 неродственных пробандов обнаружены 4 частые рекуррентные мутации (p.Arg203* — у 4, p.Arg103* — у 2, p.Arg240* — у 5, 1183+2T>C — у 2). Еще у двоих неродственных пробандов определена ранее не зарегистрированная нонсенс-мутация c.265C>T, p.(Gln89*) (N = 15/91, т. е. у 16,5% пациентов обнаружены рекуррентные мутации).

Ни одна из впервые обнаруженных мутаций не встретилась в базе данных полноэкзомного секвенирования 60 706 неродственных здоровых индивидов из разных популяций ExAc [16]. Обнаруженные небольшие внутригенные мутации в гене *PAX6* распределены по всему гену, однако большинство из них (76%, 44/58) сосредоточено в пяти экзонах: 5, 6, 7, 8 и 9.

Прямое двунаправленное секвенирование гена *PAX6* позволило выявить генетический дефект у 63,7% (58/91) пробандов с ВА. При применении секвенирования в качестве единственного метода диагностики ВА вне предлагаемой комплексной технологии его эффективность в выборке российских больных составила бы 63,7%. В 3 случаях sporadic ВА ни точечных мутаций в гене *PAX6*, ни хромосомных перестроек с вовлечением региона 11p13 не выявлено.

В итоге после применения MLPA анализа и секвенирования по Сэнгеру диагноз подтвержден у 107 пациентов с несиндромальной ВА и 7 пациентов с синдромом WAGR, определены частые в выборке пациентов из России мутации. Эффективность применения двух последовательных этапов комплексной технологии подтверждающей и дифференциальной диагностики ВА составила 96,7% (88/91).

Список литературы

1. Hingorani, M., I. Hanson, and V. van Heyningen, Aniridia. *Eur J Hum Genet*, 2012. 20(10): p. 1011-7.
2. Васильева, Т.А., и др., Дифференциальная диагностика наследственных форм врожденной аниридии с позиций современной генетики. *Вестник РАМН*, 2017. 72. — в печати.
3. Kasmann-Kellner, B., B. Seitz, Aniridia syndrome: clinical findings, problematic courses and suggestions for optimization of care («aniridia guide»). *Ophthalmologe*, 2014. 111(12): p. 1145-56.
4. Robinson, D.O., et al., Genetic analysis of chromosome 11p13 and the PAX6 gene in a series of 125 cases referred with aniridia. *Am J Med Genet A*, 2008. 146A(5): p. 558-69.
5. Crolla, J.A. and V. van Heyningen, Frequent chromosome aberrations revealed by molecular cytogenetic studies in patients with aniridia. *Am J Hum Genet*, 2002. 71(5): p. 1138-49.
6. Chen, P., et al., Mutation analysis of paired box 6 gene in inherited aniridia in northern China. *Mol Vis*, 2013. 19: p. 1169-77.
7. Gronskov, K., et al., Population-based risk estimates of Wilms tumor in sporadic aniridia. A comprehensive mutation screening procedure of PAX6 identifies 80% of mutations in aniridia. *Hum Genet*, 2001. 109(1): p. 11-8.
8. Kokotas, H. and M.B. Petersen, Clinical and molecular aspects of aniridia. *Clin Genet*, 2010. 77(5): p. 409-20.
9. Ito, Y.A., et al., Severe molecular defects of a novel FOXC1 W152G mutation result in aniridia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009. 50(8): p. 3573-9.
10. Sadagopan, K.A., et al., Aniridia-like phenotype caused by 6p25 dosage aberrations. *Am J Med Genet A*, 2015. 167A(3): p. 524-8.
11. Reis, L.M. and E.V. Semina, Genetics of anterior segment dysgenesis disorders. *Curr Opin Ophthalmol*, 2011. 22(5): p. 314-24.
12. Redeker, E.J., et al., Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) enhances the molecular diagnosis of aniridia and related disorders. *Mol Vis*, 2008. 14: p. 836-40.
13. Wawrocka, A., et al., 11p13 deletions can be more frequent than the PAX6 gene point mutations in Polish patients with aniridia. *J Appl Genet*, 2013. 54(3): p. 345-51.
14. Vasilyeva, T.A., et al., Molecular Analysis of Patients with Aniridia in Russian Federation Broadens the Spectrum of PAX6 Mutations. *Clin Genet*, 2017. 10.1111/cge.13019.
15. Васильева, Т.А., и др., Изучение генетических основ и разработка протоколов для диагностики наследственных заболеваний органа зрения на примере врожденной аниридии. *Медицинская генетика*, 2016. 15(6): с. 37-43.
16. Lek, M., et al., Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*, 2016. 536(7616): p. 285-91.